

УДК 616-097+616.24-002.5-036.17

Иммуногенные свойства модифицированных клеточных стенок *Mycobacterium tuberculosis**

В.Г. Авдиенко, И.В. Козлова, С.С. Бабаян, А.С. Зайцева,
И.В. Бочарова, В.Я. Гергерт

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва

Immunogenic properties of modified cell walls of *Mycobacterium tuberculosis*

V. Avdienko, I. Kozlova, S. Babayan, A. Zajceva, I. Bocharova, V. Gergert

Central TB Research Institute, Moscow

© Коллектив авторов, 2019 г.

Резюме

Клеточная оболочка *M. tuberculosis* в зависимости от фазы роста содержит от 40 до 70% белка. Белки обеспечивают рецепторно-избирательную проницаемость, создают систему пор, защищают от переваривания в фагосоме и от иммунной системы хозяина, система токсин-антитоксин позволяет бороться с другими бактериями. Изучены иммунологические свойства антигенов дигестивно- и химически-модифицированной клеточной стенки *M. tuberculosis* (КС), в которых в результате воздействия были разрушены практически все белки. **Материалы и методы исследования.** Проведена обработка КС протеиназой К (КС-prK), или 5N NaOH (КС-NaOH). Мыши BALB/c проиммунизированы модифицированными КС, в иммуноблоттинге изучены спектры полученных антител. В ИФА исследована реакция противотуберкулезных моноклональных антител (МАТ) с КС. На 112 сыворотках больных туберкулезом, микобактериозами, другими нетуберкулезными заболеваниями и здоровых доноров изучены диагностические показатели модифицированных КС. **Результаты.** Иммуноблоттинг с гипериммунными сыворотками мышей выявил сужение спектра распознаваемых антигенов с 30 полос при иммунизации исходным препаратом до 17 КС-prK и 14 КС-NaOH.

В ИФА с МАТ реакция с белками МРТ63, МРТ64, 25 кДа полностью исчезала. С гликопротеинами HspX, МРТ83, Ag85, 38 кДа, pstS/phoS и гликолипопротеином LpqH наблюдали различные образцы связывания в зависимости от распознаваемых МАТ эпитопов. Необычную реакцию выявляли против Rv1681 (молибдоптерин), наряду с потерей связывания после модификации КС наблюдали увеличение реакции, что возможно указывало на экранированность некоторых участков антигена, которая исчезала после обработки NaOH. МАТ против CFP10, Rv0009 (18–19 кДа), Rv0341 и углеводного антигена >30 кДа реагировали после любой обработки, что объясняется особой компарментализацией этих антигенов внутри пор цитоплазматической мембраны или микомембраны. Исследования IgG в сыворотке больных с модифицированными антигенами не выявили более высоких значений показателей специфичности и чувствительности в сравнении с исходным препаратом КС. Замечено достоверное увеличение аффинности/концентрации выявляемых противотуберкулезных IgG антител как в сыворотках иммунных животных, так и в сыворотках больных туберкулезом легких, особенно выраженное на препаратах КС-NaOH. **Заключение.** Дигестивная и химическая обработка КС позволила исследовать осо-

* Работа выполнена в рамках темы НИР № 0515-2019-0018 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного звеньев иммунного ответа при туберкулезе и интерстициальных заболеваниях легких».

бенности скрытых антигенов КС *M. tuberculosis* и иммунный ответ на них у человека и животных.

Ключевые слова: микобактериальная клеточная стенка, химическая модификация, дигестивная обработка, моноклональные антитела, сыворотки

Summary

The envelope of *M. tuberculosis* contains from 40 to 70% protein in depending from the growth phase. Proteins supports receptor-selective permeability, create a pore system, perform protection from phagosomal digestion and guard from the host immune system, and the toxin-antitoxin allows to fight with other bacteria. Immunological properties of antigens of the digestive and chemically modified cell wall of *M. tuberculosis* (CW) were studied, in which almost all proteins were destroyed as a result of the impact. **Materials and methods of research.** The CW were treated with proteinase K (CW-prK), or 5N NaOH (CW-NaOH). The mice BALB/c were immunized with modified CW and the spectra of the obtained antibodies were studied in immunoblotting. In ELISA investigated the reaction of tuberculosis monoclonal antibodies (mAbs) with the CW. Diagnostic parameters of modified CW were studied on 112 sera of patients with tuberculosis, mycobacteriosis, other non-tuberculosis diseases and healthy donors. **Results.** Immunoblotting with hyperimmune mouse sera revealed a narrowing of the spectrum of recognized antigens from 30 bands

with immunization the initial CW to 17 bands by CW-prK and 14 bands by CW-NaOH. Reaction mAbs with proteins MPT63, MPT64, 25 kDa completely disappeared in ELISA. With glycoproteins HspX, MPT83, Ag85, 38 kDa, pstS/phoS and glycolipoprotein LpqH observed different patterns of binding depending on the epitopes recognized by mAbs. An unusual reaction was detected with Rv1681 (molybdopterin). Along with the loss of binding after modification of CW, an increase in the reaction was observed, which may indicate the shielding of some parts of the antigen that disappeared after treatment. mAbs to CFP10, Rv0009 (18–19 kDa), Rv0341 and carbohydrate antigen >30 kDa reacted after any treatment, due to the special compartmentalization of these antigens inside the pores of the cytoplasmic membrane or mycomembrane. Studies of IgG in serum of patients with modified antigens did not reveal higher values of specificity and sensitivity in comparison with the initial preparation of CW. There was a significant increase in affinity/concentration of detected anti-TB IgG antibodies both in the sera of immune animals and in the sera of patients with pulmonary tuberculosis, especially expressed in preparations of CW-NaOH. **Conclusion.** Digestive and chemical treatment of CW allowed to investigate the features of hidden antigens of *M. tuberculosis* and immune response in humans and animals.

Keywords: mycobacterial cell wall, chemical modification, digestive treatment, monoclonal antibodies, sera

Введение

Жизненно важным компонентом всех микобактерий является клеточная оболочка, защищающая бактериальную клетку от окружающей среды, обеспечивая при этом механическую устойчивость, транспорт растворов и белков, адгезию к рецепторам. Ключевой особенностью микобактерий является большое содержание жиров — до 40% сухого веса, в клеточной стенке до 60% липидов, в сравнении с 20% у грамотрицательных бактерий [1]. Эти липиды включают жирные кислоты с длинными цепями (миколовые кислоты), ковалентно «сшитые» с арабиногалактанами, в свою очередь, связанными эфирной связью с трегалозой. Данные соединения создают ряд компонентов, по которым типизируют микобактерии. Липиды микобактерий придают уникальные свойства микобактериям, например, устойчивость к большинству антибиотиков, за исключением стрептомицина и рифамицинов, за счет снижения проницаемости мембраны в 100–1000 раз в сравнении с грамотрицательными бактериями [2]. Одна из последних моделей клеточной обо-

лочки схематически делит ее на три слоя [3]: внешний слой, также называемый капсулой у патогенных видов, ядро клеточной стенки и традиционную плазматическую мембрану. Капсула *M. tuberculosis* скомпонована из глюкана с небольшим количеством липидов и белков, сходных с белками непатогенных микобактерий. Относительное соотношение углеводов и белков в капсуле микобактерий варьирует от 3:2 до 3:7 в зависимости от фазы роста штамма [4].

Белки клеточной стенки являются наиболее иммуногенным ее компонентом. В геноме микобактерий имеется более 2000 генов белков, из которых в клеточной стенке и плазматической мембране экспрессируются более 200. Если пересчитать количество известных на сегодняшний день белков, осуществляющих свои функции в клеточной оболочке *M. tuberculosis*, то выйдет следующая статистика [5].

Белки, участвующие в синтезе клеточной оболочки: синтез миколовых кислот — 9 белков; синтез фтиоцерол димикоцерозата (PDIM) и его транспорт — 10 белков; синтез пептидогликана — 15 белков; биосинтез капсулы — 9 белков; биосинтез липогликанов

(LM, LAM, PI) — 4 белка. Белки мембранного транспорта: Sec и Tat пути экспорта белков — 7 белков; MmpL-транспортеры липидов и белков (микобактерина) — 11 белков; АТФ-связывающий ABC-транспортер — 22 белка; система секреции Type VII ESX ~ 12 белков; другие транспортные белки — 7 белков. Регуляторные белки — около 29 белков. Белки теплового шока — 7 белков. Белки семейства MCE (компоненты ABC-транспортера липидов) — 15 белков. Белки, отвечающие за антимикробную устойчивость, — 26 белков. Белки-мишени лекарственных препаратов — 10 белков.

Большинство из них гликозилированы, что создает преобладающую основу для взаимодействий хозяин-патоген, повышает иммуногенность и вирулентность, а также антимикробную устойчивость. Гликозилирование в *M. tuberculosis* главным образом было обнаружено на белках капсулы клеточной стенки и на некоторых других протеинах мембраны [6]. Это оказывается очень важным для антигена 85 (30–32 кДа), который состоит из трех белков (Ag85A, Ag85B, и Ag85C), обладает миколитрансферазной активностью и участвует в конъюгации миколовых кислот с арабиногалактаном клеточной стенки и в биогенезе трегалозомиколата (TMM) и трегалозодимиколата (TDM) — корд-фактора, крайне важных для процессов деления и роста микобактерии [7].

Периплазматическое пространство отделяет микомембрану от плазматической мембраны, которая состоит из фосфолипидной бислоидной мембраны с интегрированными белками [8].

Наиболее известными из них являются MmpL белки, ответственные за экспорт гидрофобных субстратов для строительства клеточной стенки и секреции. В эту группу входят 13 белков с большой молекулярной массой >100 кДа, способных содержать до 11–12 трансмембранных доменов. MmpL белки можно считать факторами вирулентности, поскольку каждый из них транслоцирует через мембрану вирулентный компонент. MmpL3 переносит TMM/TDM и AGP — арабиногалактан/пептидогликановый комплекс. Эти компоненты необходимы как для целостности микомембраны, так и для внутриклеточного выживания микобактерии, а также они важны при образовании гранул. MmpL4 и частично MmpL5 совместно со своими субстратами MmpS4 и MmpS5 переносят карбоксимикобактин, необходимый для транспорта железа внутрь микобактерии. MmpL5 и MmpL7 участвуют в обратном рефлюксе антибиотиков, попавших внутрь микобактерии; кроме того, MmpL7 в присутствии с DrrABC (Rv2936-8) экспортирует в периплазматическое пространство фтиоцерол димикоцерозаты (PDIM), которые через белок-липидное взаимодействие с липопротеином LppX (Rv2945c) попадают на

поверхность клетки [9]. PDIM играет множественную роль в вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*. Гидрофобная природа PDIM ограничивает проницаемость клеточной оболочки и создает внутреннюю устойчивость против антимикробных компонентов [10]. PDIM также способствует включению бациллы макрофагами и нарушает фагосома-лизосомальное слияние [11]. Дополнительно PDIM увеличивает вирулентность за счет маскировки распознавания патогена под молекулярные образцы рецепторов врожденного иммунитета [12]. Кроме того, в плазматической мембране клеточной стенки содержится много ферментов — маннозилтрансферазы PimB, галактофуранозилтрансферазы GlfT2, цитохрома P450 и ABC транспортер Yjff (inner membrane ABC transporter permease protein). Помимо классических фосфолипидов, там в больших количествах присутствуют липогликаны, фосфатидилманнозиды [13].

Ядро клеточной стенки — это гигантский комплекс, который условно состоит из трех частей: внешняя часть — микомембрана, средняя — арабиногалактан и внутренняя часть — слой пептидогликана. Микомембрана представляет нетрадиционную бислоидную мембрану и состоит из миколовых кислот, этерифицированных арабиногалактаном, который ковалентно прикреплен к пептидогликану через фосфорил-N-ацетилглюкозаминозилрамнозил в арабиногалактан, который, в свою очередь, этерифицируется в α -алкил-, β -гидрокси-длинноцепочечные миколовые кислоты, образуя комплекс миколит-арабиногалактан-пептидогликан. Внешний слой микомембраны скомпонован из липидов, экстрагируемых органическими растворителями: фосфолипидами, трегалозомиколатами, гликопептидолипидами и липогликанами. Стимулируя макрофаг через индукцию C-type lectin (Mincle), TMM и TDM приводят к выработке цитокинов и оксида азота [14], в то же время TDM — это один из компонентов, приводящий к задержке фагосомального созревания [15]. Ди- и полиацитлтрегалозы (DAT, PAT) и сульфоллипид имеются только у микобактерий *M. tuberculosis complex* [1]. Ацильные цепи этих липидов синтезируются поликетидной синтазной системой PKS, которая приводит к полиметилляции углеродных цепей [16]. Они также нарушают фагосомальное созревание, но все-таки основная роль в этом процессе принадлежит PDIM [17]. Продукция сульфоллипидов (SL) микобактерией регулируется двухкомпонентной регуляторной системой, влияющей на вирулентность [18]. Кроме того, идентифицируя факторы, модулирующие NF- κ B-зависимый сигналинг, показано, что SL является антагонистом Toll-like рецептора 2. Как сказано выше, PDIM — семейство длинноцепочечных β -диолов, этерифицированных с полиметилцепочечными жирными кислотами,

способных встраиваться в плазматическую мембрану клетки хозяина и повреждать при этом активность рецепторов фагосомы [19]. Маннозильная форма липоарабиноманнана (LAM-B) — один из ключевых факторов вирулентности МТБ. Этот поверхностный липогликан заякорен к внутренним и наружным мембранам клеточной стенки через инозитол фосфат маннозид [20]. Маннозильная форма известного липида микомембраны LAM-B — это единственное открытое соединение, которое не разрушается в организме хозяина, а выводится из организма, связываясь в печени с желчными кислотами. Существуют тесты, позволяющие эффективно выявлять его в моче больных туберкулезом [21].

Наиболее сложной и удивительной частью клеточной стенки микобактерий является микомембрана. Ее толщина составляет всего 7–8 нм, несмотря на то, что скомпонована она из длинных миколовых кислот длиной до С90. Внешняя часть микомембраны содержит белки-порины для включения маленьких гидрофильных молекул. Например, OmpATb (Rv0899), который имеет небольшую схожесть с OmpA-семейством грамотрицательных бактерий. Этот белок формирует каналы в липидной мембране и захватывает серин, но не глицин [22]. Описан и другой пороформирующий белок MctB (Rv1698), обладающий канальной активностью в микомембране, предотвращающий накопление Си внутри периплазматического пространства клеточной оболочки, куда его доставляет из цитоплазмы через цитоплазматическую мембрану транспортер CtpV, за счет взаимодействия с Си-связывающим металлотионеином MymT [24]. Для включения питательных веществ бацилла туберкулеза имеет целый ряд энергозатратных рецепторов. Так, для включения железа в Mtb есть полярный микобактин, ассоциированный с клеточной стенкой, который в паре с более полярным секретрируемым карбоксимикобактином образует сидерофоры для захвата ионов Fe²⁺, которые транспортируются через внутреннюю мембрану посредством ABC-транспортера, содержащего для этого два белка — IrtA и IrtB, необходимые для экспорта сидерофоров через внутреннюю мембрану. Это АТР/ГТР-зависимый процесс, в отличие от нетуберкулезных микобактерий и от грамотрицательных, где сидерофоры пассивно диффундируют через MspA-пору, отсутствующую у вирулентных микобактерий [24].

Для секреции же белков из клетки в Mtb существует особая транспортная система типа VII, состоящая из пяти супрамолекулярных помп Esx1-Esx5, которые участвуют в переносе через микомембрану ряда факторов вирулентности: белков ESAT-6 и Cfp10 (Esx-1), PE25/PPE41 через Esx-5, и более 100 других PE/PPE белков. Этот процесс весьма сложный и энер-

гозатратный, требующий надмолекулярной организации поры из пяти компонентов (EssVx-EssEx) и трансмембранного компонента субтилизин-сходной протеазы типа микозина (MucPx), подготавливающей субстрат и стабилизирующей мембранный поровый комплекс ESX [25].

Существует также система белков токсин-анти-токсин, способная защищать бациллу от других бактерий во внешней среде [26]. Кроме того, мембранные белки требуются для синтеза липидов на внешней мембране, например, белок Imp (MT18B_2092, инозитол-1-монофосфатаза), который вставляет ЛПС во внешнюю мембрану микобактерии [9]. Кроме того, в клеточной стенке микобактерии находятся липазы, эстеразы и многие другие белки, заякоренные или интегрированные во внешнюю мембрану, необходимые для прикрепления и инвазии, то есть осуществляющие свои функции на поверхности клетки.

Даже из этого краткого обзора ясно, насколько сложна структура клеточной стенки Mtb, и непонятно, каким образом она способна сохранять функции белкового и рецепторного аппарата в агрессивных условиях внешней среды, межтканевой жидкости и фагосомы хозяина. Именно поэтому определение композиции, локализации и организации внешнего слоя и микомембраны клеточной стенки является наиболее важным и значимым в наших знаниях о физиологии и патогенности микобактерий. И, конечно, протеазо- и химически устойчивые антигены микобактерий, о которых отсутствует информация в мировой литературе, представляют несомненный интерес для исследовательских целей, иммунодиагностики и иммунотерапии туберкулеза.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: изучить иммунологические свойства антигенов дигестивно и химически модифицированной клеточной стенки *M. tuberculosis*.

Для выполнения этой цели были поставлены следующие задачи: провести анализ связывания противотуберкулезных моноклональных антител (МАТ) с модифицированными антигенами; получить гипериммунные сыворотки мышей; исследовать спектры антигенов, распознаваемых ими в иммуноблоттинге; оценить диагностическую эффективность исследования IgG больных туберкулезом легких, микобактериозами и другими нетуберкулезными заболеваниями с модифицированными антигенами клеточной стенки *M. tuberculosis*.

Материалы и методы исследования

Сыворотки 42 больных туберкулезом легких (22 — инфильтративный туберкулез, 10 —

фиброзно-кавернозный туберкулез, 4 — диссеминированный туберкулез, 4 — туберкулома, 1 — очаговый туберкулез, 1 — туберкулез внутригрудных лимфоузлов), 14 пациентов с микобактериозами (9 — *M. avium*, 2 — *M. intracellulare*, 2 — *M. abscessus* и 1 — *M. xenopi*) и 28 пациентов с нетуберкулезными заболеваниями легких (4 — пневмония, 3 — хроническая обструктивная болезнь легких, 6 — фиброзный альвеолит, 8 — бронхиальная астма, 4 — экзогенный аллергический альвеолит, 3 — бронхит) были получены из клинических отделений ФГБНУ ЦНИИТ, сыворотки 42 здоровых доноров — со станции переливания крови.

В экспериментах применяли лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv из коллекции ФГБНУ «ЦНИИ туберкулеза», Москва, которого выращивали в синтетической среде Сотона в течение 28 дней при 37 °С. Троекратно отмывали забуференным фосфатом раствором (PBS), ресуспендировали в небольшом объеме PBS, в суспензиях определяли концентрацию белка по Брэдфорду.

Ультразвуковые дезинтеграторы (УЗД) *M. tuberculosis* H37Rv были приготовлены из отмытой бактериальной массы на ультразвуковом дезинтеграторе MSE при 300 Вт в течение 30 мин при интенсивном охлаждении. Содержание белка определяли методом Брэдфорда.

Препараты клеточной стенки (КС) получали многократной отмывкой осадка УЗД *M. tuberculosis* H37Rv в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) с последующей обработкой 1 мг/мл протеиназой К (КС-prK), или 5N NaOH (КС-NaOH) в течение ночи при 37 °С, или не обрабатывали (КС-PBS). Осадки троекратно отмывали в большом объеме PBS, ресуспендировали, в суспензиях определяли концентрацию белка.

Поликлональные сыворотки мышей. Мышей линии BALB/c, выращенных в виварии ФГБНУ ЦНИИТ, иммунизировали препаратами клеточных стенок *M. tuberculosis* H37Rv (КС-PBS, КС-prK и КС-NaOH) по схеме 0, 14, 28-й день в неполном адьюванте Фрейнда в количестве 50 мкг на животное. На 42-й день иммунизации у мышей собирали кровь из орбитального венозного синуса и получали сыворотки.

Иммуноблоттинг (*Western blotting*). Иммуноблоттинг проводили согласно стандартной методике Western blot на расфракционированном в редуцирующих условиях в диск-электрофорезе в 12,5% ПААГ КС-PBS по Towbin и затем денситометрировали.

В исследовании использовали антимикуобактериальные моноклональные антитела (МАТ), полученные ранее против цельных клеток *M. tuberculosis* H37Rv. Специфичность МАТ в основном была против антигенов *M. tuberculosis* complex [27].

Непрямой иммуноферментный анализ (ИФА) использовали для изучения реакции МАТ и сывороток людей с модифицированными препаратами клеточных стенок. Для этого на планшеты наносили УЗД *M. tuberculosis* H37Rv или модифицированные антигены КС в PBS в концентрации 10 мкг/мл. После инкубации в течение ночи при 4 °С отмывали и блокировали 1% BSA в PBS, содержащем 0,01% Tween20 (PBST). Далее в лунки вносили разведения сывороток людей или супернатанты МАТ. После инкубации с МАТ реакцию проявляли иммунопероксидазным конъюгатом против IgG мыши (Jackson Imm.Res.Lab, США), а реакцию с антителами сывороток больных МАТ F5 против IgG человека, меченных пероксидазой хрена [28]. Цветную реакцию развивали в 50 мМ цитратно-ацетатном буфере (рН 5,2) с помощью тетраметилбензидина (ТМБ) и считывали при 450 нм.

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили стандартными методами оценки вариационных показателей, дающих оценку достоверных различий средних значений между группами по критерию Стьюдента и наличие ассоциаций в изучаемых выборках при проведении корреляционного анализа. Диагностические показатели специфичности, чувствительности и другие показатели эффективности рассчитывали согласно формулам и определениям, приведенным R.D. Smith [29].

Результаты исследования

После обработки в отмытых суспензиях модифицированных антигенов КС *M. tuberculosis* H37Rv определяли концентрацию белка. В исходном препарате КС-PBS она составила 2,495 мг/мл, в КС-prK — 247 мкг/мл и в КС-NaOH — 76 мкг/мл.

На 42-й день иммунизации модифицированными препаратами КС у мышей была взята кровь и получены сыворотки. Сыворотки были исследованы в иммуноблоттинге на расфракционированном в диск-электрофорезе исходном антигене КС-PBS (рис. 1). Более наглядно спектры антигенов, распознаваемых сыворотками, представлены на денситометрии иммуноблоттинга (рис. 2).

Иммуноблоттинг с сыворотками мышей, иммунизированных препаратом КС-PBS, выявил спектр связывания в области 10–150 кДа с более чем 30 антигенами, в отличие от более узкого спектра в области 10–100 кДа, полученного в реакции сывороток против КС-prK (с 17 полос распознавания) и КС-NaOH (14 распознанных антигенов).

При исследовании реакции полученных ранее МАТ против цельных клеток *M. tuberculosis* H37Rv в ИФА с исходным препаратом КС-PBS и модифицированных КС-prK и КС-NaOH были проанализированы

34 МАТ против 14 известных антигенов (табл. 1). Из приведенной таблицы можно выявить следующие образцы связывания МАТ с исследуемыми антигенами:

- когда обработка приводила к полному исчезновению реакции — МАТ против МРТ63, МРТ64, 38 кДа (некоторые МАТ), 25 кДа, HSP 16–18 кДа (некоторые МАТ);
- когда реакция сохранялась после обработки протеиназой К, но не NaOH — МАТ против Lpq H (19 кДа) (некоторые МАТ), МРТ83, Ag85, 38 кДа;
- реакции не было с KC-prK, но была KC-NaOH — МАТ против Lpq H (19 кДа) (некоторые МАТ), Rv0009 (18–19 кДа) (некоторые МАТ);
- реакция не исчезала (или не исчезала полностью) с МАТ против CFP10, Lpq H (19 кДа), pstS/phoS (37, 38, 40 кДа), белка Rv1681 (50 и 75 кДа), Rv0341 и против углеводсодержащего эпитопа на антигенах с молекулярной массой более 30 кДа.

Определение противотуберкулезных IgG антител сывороток больных туберкулезом легких, нетуберкулезных заболеваний легких и здоровых доноров проводили в непрямом ИФА. Полученные результаты сведены в таблицу (табл. 2) и для наглядности представлены в виде точечных рисунков (рис. 3).

Диагностика IgG сывороток больных и здоровых доноров на модифицированных и исходных антигенах выявила следующие результаты: KC-PBS (эффективность 69,56%, чувствительность 81,50%, специфичность 43,05%, концентрация специфических IgG у туберкулезных больных 25 мкг/мл, у нетуберкулезных — 30 мкг/мл, у здоровых доноров — 1,5 мкг/мл); KC-prK (62,55; 81,59 и 41,44%, концентрация IgG 38,6; 4,5 и 1 мкг/мл соответственно); KC-NaOH (64,66; 70,87

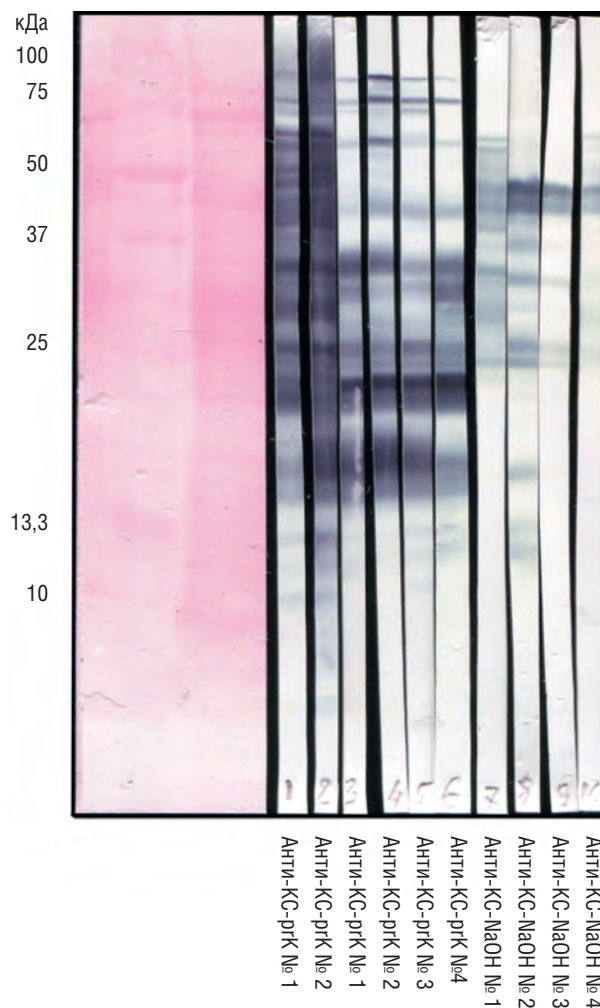


Рис. 1. Иммуноблоттинг сывороток мышей BALB/c, иммунизированных исходным препаратом KC-PBS или модифицированными KC-prK и KC-NaOH

Таблица 1

Реакция антимикобактериальных МАТ с модифицированными антигенами KC, % от исходного антигена

МАТ	Распознаваемый антиген	KC-PBS	KC-prK	KC-NaOH
2F9	CFP10	100,00	4,56	11,40
1G2		100,00	106,25	235,94
3G5		100,00	84,51	178,26
1E5	MPT63	100,00	0,21	0,22
2H2		100,00	1,00	0,80
S4C1G4G7	HspX (alpha-crystallin homolog)	100,00	0,99	1,37
D4		100,00	49,37	58,85
4H4E7E2		100,00	28,54	21,70
MBS19 (3F1D9H11)	LpqH (19 кДа)	100,00	11,04	38,56
B3H9		100,00	43,35	4,16

МАТ	Распознаваемый антиген	КС-PBS	КС-prK	КС-NaOH
2E11A3	Rv0009 (18–19 кДа)	100,00	3,30	6,96
1E5		100,00	28,48	22,72
2H3		100,00	0,97	0,97
1C10G10	MPT83	100,00	36,67	1,72
2G11C12		100,00	35,06	0,86
2H3C6	MPT64	100,00	0,77	0,38
1A6	Ag85B (30 кДа)	100,00	89,24	1,27
1A5		100,00	11,02	4,66
S2F2E2		100,00	38,48	0,90
1G4	pstS/phoS (37, 38, 40 кДа)	100,00	0,59	4,71
1C1		100,00	16,28	32,22
1D10H3		100,00	20,93	31,40
1F2A7	PstS1 (38 кДа)	100,00	3,79	7,42
2B1A3		100,00	36,78	1,23
2D9	Rv1681 (50 и 75 кДа)	100,00	47,94	79,41
2H11D1		100,00	6,62	12,15
1F1		100,00	100,72	217,39
2E8C2	25 кДа	100,00	0,52	0,06
3A12F3		100,00	3,19	5,54
2E3	Rv0341	100,00	21,78	21,20
2F5	Углеводный эпитоп >30 кДа	100,00	5,90	8,28
3E10F10		100,00	36,43	11,63
1E4B10		100,00	60,44	55,02
S3A4D4		100,00	20,50	33,18

Таблица 2

Диагностические показатели исследования противотуберкулезных IgG антител больных и здоровых доноров на модифицированных клеточных стенках *M. tuberculosis* H37Rv

Показатель	КС-PBS	КС-prK	КС-NaOH
Истинное превазирование, %	0,389	0,389	0,49
Предсказательная оценка положительного теста, %	0,750	0,674	0,711
Предсказательная оценка отрицательного теста, %	0,500	0,500	0,272
Точка раздела, мкг/мл	1,819	1,281	1,107
Специфичность, %	50,50	43,98	56,69
Чувствительность, %	81,81	80,51	69,26
Эффективность, %	73,76	64,26	64,85

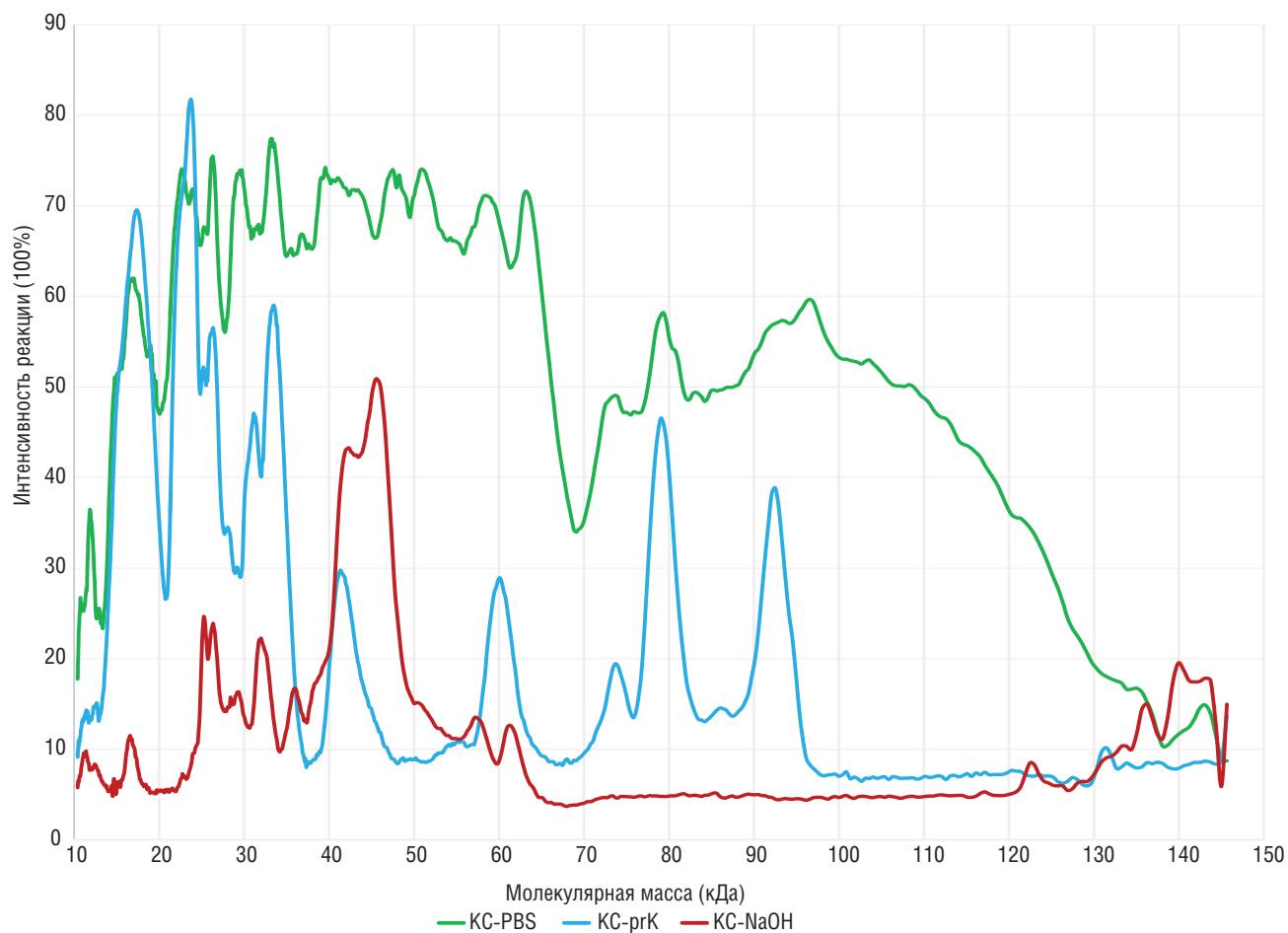


Рис. 2. Денситометрия иммуноблоттинга сывороток BALB/c, иммунизированных модифицированными препаратами KC

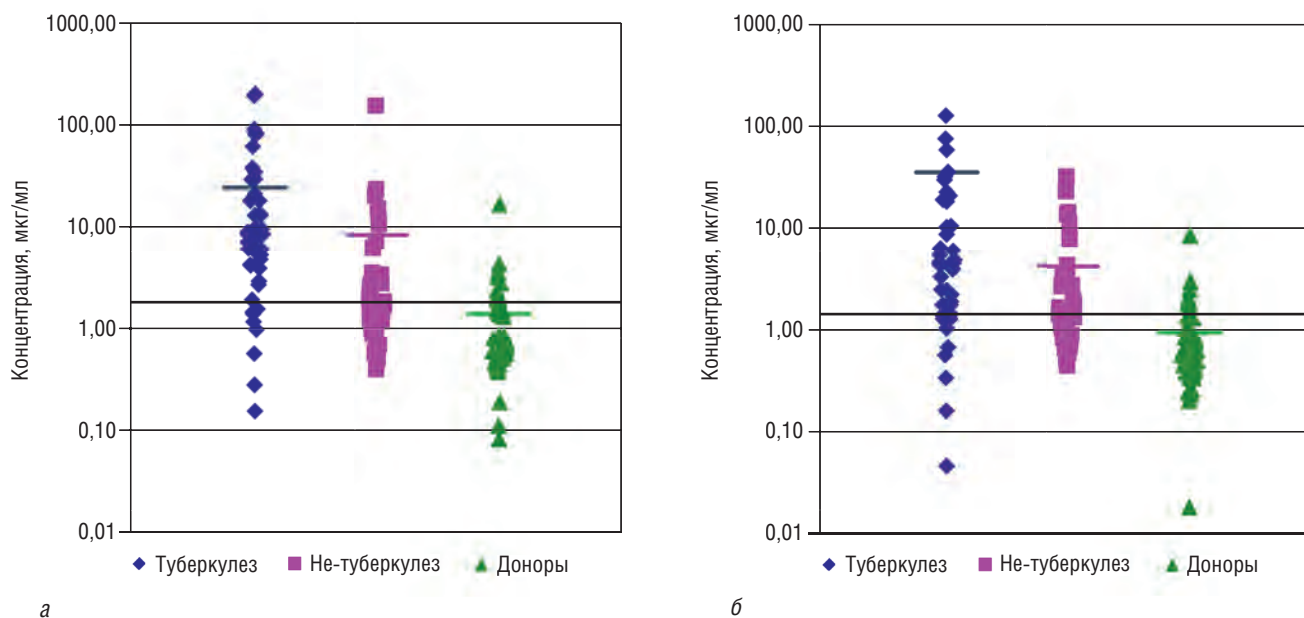
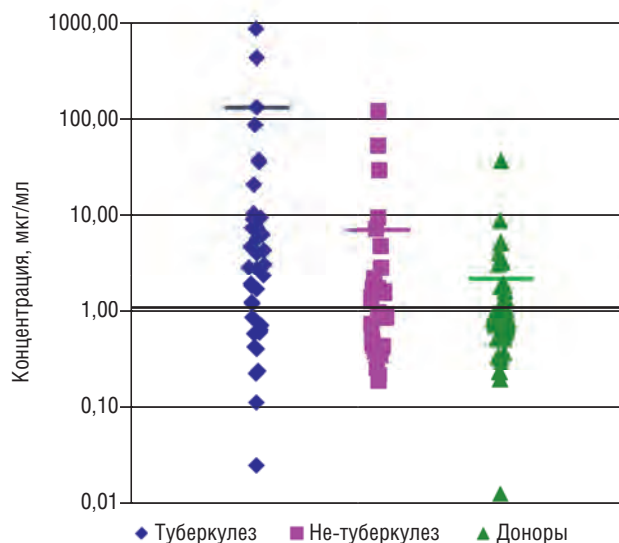


Рис. 3. Точечные диаграммы концентраций противотуберкулезных IgG в сыворотках больных туберкулезом, нетуберкулезными заболеваниями и здоровых доноров в реакции с исходным препаратом KC-PBS (а) и модифицированными KC-prK (б)



в

Рис. 3. Окончание. Точечные диаграммы концентраций противотуберкулезных IgG в сыворотках больных туберкулезом, нетуберкулезными заболеваниями и здоровых доноров в реакции с КС-NaOH (в)

и 54,67%, концентрация IgG 153,0; 6,7 л и 2,2 мкг/мл соответственно).

Обсуждение результатов

Дигестивная и химическая обработка клеточных оболочек *M. tuberculosis* приводит к заметному уменьшению содержания белка, в 10 раз при обработке протеиназой и более чем в 30 раз при жестком гидролизующем действии щелочи. Это достаточно сильное воздействие, если учесть, что содержание белка в клеточной стенке может составлять от 40 до 70% сухого веса микобактерии в зависимости от фазы роста штамма [4]. Эти изменения в иммуногенности препаратов становятся заметны при исследовании антител сывороток иммунных животных. Во-первых, происходит сужение спектра распознаваемых антигенов иммунными сыворотками мышей, а во-вторых, увеличиваются сроки иммунизации. Для получения полноценного ответа на препарат КС-NaOH потребовалось 1,5 мес по сравнению с 2–3 нед при использовании исходного препарата КС. То есть уменьшение содержания белка в КС микобактерии приводит к снижению ее иммуногенности.

Ожидаемые результаты были получены при анализе связывания МАТ, направленных против негликозилированных белков *M. tuberculosis* МРТ63, МРТ64, 25 кДа, обработка которых практически полностью исключала реакцию с МАТ. Известные гликопротеины HspX, МРТ83, Ag85, 38кДа, pstS/phoS и гликолипопротеин LpqH (19 кДа) показали различные образцы свя-

зывания с различными МАТ. По-видимому, это связано с химической природой распознаваемого антигена, и при его экранировании углеводной частью связывание сохраняется, после обработки протеиназой, но не после гидролиза NaOH, для антигенов МРТ83, Ag85, 38 кДа. Необычные образцы реакции проявляются с МАТ против Rv1681 (молибдоптерин), где наряду с потерей связывания МАТ после модификации КС наблюдается ее увеличение после модификации, что возможно указывает на протеазоустойчивость некоторых эпитопов. Этот факт частично подтверждается наличием Rv1681 в моче больных туберкулезом [30].

Различные реакции КС с МАТ могут указывать как на разную степень протеазоустойчивости, так и на различную локализацию распознаваемых антигенов, что происходит в случае CFP10, Rv0009 (18–19 кДа), Rv0341 и углеводного антигена >30 кДа, небольшое связывание с которыми сохраняется после любой обработки. Это можно объяснить особой компартиментализацией этих антигенов, в случае Rv0009 (возможная железо-регулируемая пептидил-пролил-цис-трансизомераза (PPIase A/rotamase A), усиливает скручивание/фолдинг белков) и Rv0341 (изониазид индуцируемый генный белок IniB) — прочные агрегаты в цитоплазматической мембране [31]. Секретируемый же белок CFP10, вероятно, находится в комплексе с субъединицами трансмембранного домена поры специализированной секреции VII типа [25].

Диагностические свойства модифицированных препаратов КС показали меньшую диагностическую эффективность в сравнении с исходным препаратом, но при этом специфичность препарата КС-NaOH (чувствительность 69,26%, специфичность 56,69%) незначительно увеличилась в сравнении с исходным препаратом КС-PBS (81,81%, 50,50%) и КС-prK (80,51%, 43,98%), которые показали сходные диагностические показатели чувствительности. Тем не менее концентрация выявляемых IgG у больных туберкулезом на КС-NaOH возросла более чем в 5 раз (25 мкг/мл против 132 мкг/мл в исходном препарате, $p < 0,05$), при этом концентрация специфических антител у больных нетуберкулезными заболеваниями осталась практически неизменной (8,52 мкг/мл против 7,13 мкг/мл).

Таким образом, дигестивная и химическая обработка клеточных стенок *M. tuberculosis* приводит к значительному уменьшению количества иммуногенных антигенов. При этом наблюдается явное увеличение аффинности/концентрации противотуберкулезных антител как в сыворотках иммунных животных, так и в сыворотках больных туберкулезом легких при незначительном увеличении их специфичности.

Новые МАТ против модифицированных препаратов КС позволят получить уточняющую информацию

об антигенах, входящих в состав этого сложного компартмента микобактериальной клеточной стенки, и ее строении.

Выводы

1. ИФА МАТ с модифицированными антигенами выявил четыре типа реакции: во-первых, связанной с химической природой антигенной детерминанты на белках и, во-вторых, на гликопротеинах, в-третьих, дезавуирование экранированных эпитопов и, в-четвертых, особая компартиментализация антигенов в КС микобактерий.
2. Иммуногенность и спектр микобактериальных антигенов, распознаваемых гипериммунными сыворотками мышей, против препаратов КС микобактерий напрямую связаны с уменьшением

содержания белка в модифицированных препаратах, приводящим к снижению их иммуногенности и сужению спектра распознаваемых антигенов.

3. Оценка диагностической эффективности исследования IgG больных туберкулезом легких, микобактериозами и другими нетуберкулезными заболеваниями с модифицированными антигенами клеточной стенки *M. tuberculosis* не выявила качественно более высоких значений показателей специфичности и чувствительности в сравнении с исходным препаратом КС.
4. Достоверное увеличение аффинности/концентрации выявляемых противотуберкулезных IgG антител как в сыворотках иммунных животных, так и в сыворотках больных туберкулезом легких наблюдается в препаратах КС после жесткой обработки щелочью.

Список литературы

1. Daffé M., Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 1998; (39): 131–203.
2. Jarlier V., Nikaido H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J. Bacteriol.* 1990; 172 (3): 1418–1423.
3. Daffé M., Quémar A., Marrakchi H. Mycolic Acids: From Chemistry to Biology. *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes* 2017: 1–36. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-43676-0_18-1.
4. Ortalo-Magné A., Dupont M-A., Lemassu A. et al. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* 1995; (141): 1609–1620.
5. Birhanu A.G., Yimer S.A., Kalayou S. et al. Ample glycosylation in membrane and cell envelope proteins may explain the phenotypic diversity and virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 2927. doi: 10.1038/s41598-019-39654-9.
6. Calder B., Soares N.C., de Kock E. et al. Mycobacterial proteomics: analysis of expressed proteomes and posttranslational modifications to identify candidate virulence factors. *Expert. Rev. Proteomics.* 2015; (12): 21–35. <https://doi.org/10.1586/14789450.2015.1007046>.
7. Hodges H.L., Brown R.A., Crooks J.A. et al. Imaging mycobacterial growth and division with a fluorogenic probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018; 115 (20): 5271–5276. doi: 10.1073/pnas.1720996115.
8. Zuber B., Chami M., Houssin C. et al. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J. Bacteriol.* 2008; 190 (16): 5672–5680. doi: 10.1128/JB.01919-07.
9. Sulzenbacher G., Cnaan S., Bordat Y. et al. LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J.* 2006; 25 (7): 1436–1444.
10. Rousseau C., Winter N., Pivert E. et al. Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol.* 2004; 6 (3): 277–287.
11. Lerner T.R., Queval C.J., Fearn A. et al. Phthiocerol dimycocerosates promote access to the cytosol and intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* in lymphatic endothelial cells. *BMC Biol.* 2018; 16 (1): 1. doi: 10.1186/s12915-017-0471-6.
12. Cambier C.J., Takaki K.K., Larson R.P. et al. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature.* 2014; 505 (7482): 218–222. doi: 10.1038/nature12799.
13. Chiaradia L., Lefebvre C., Parra J. et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 12807. doi: 10.1038/s41598-017-12718-4.
14. Ishikawa E., Ishikawa T., Morita Y.S. et al. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J. Exp. Med.* 2009; 206 (13): 2879–2888. doi: 10.1084/jem.20091750.
15. Indrigo J., Hunter R.L.Jr, Actor J.K. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology.* 2003; 149 (Pt. 8): 2049–2059.
16. Rousseau C., Sirakova T.D., Dubey V.S. et al. Virulence attenuation of two Mas-like polyketide synthase mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 2003; 149 (Pt. 7): 1837–1847.
17. Passemar C., Arbués A., Malaga W. et al. Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of *Mycobacterium tuberculosis* reveal functional overlap of cell envelope lipids in host-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 2014; 16 (2): 195–213. doi: 10.1111/cmi.12214.
18. Gonzalo-Asensio J., Malaga W., Pawlik A. et al. Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111 (31): 11491–11496. doi: 10.1073/pnas.1406693111.
19. Astarie-Dequeker C., Le Guyader L., Malaga W. et al. Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog.* 2009 Feb; 5 (2): e1000289. doi: 10.1371/journal.ppat.1000289.
20. Gaur R.L., Ren K., Blumenthal A. et al. Correction: LprG-Mediated Surface Expression of Lipoarabinomannan Is Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2015; 11 (12): e1005336. doi: 10.1371/journal.ppat.1005336.

21. *Hamasur B., Bruchfeld J., van Helden P. et al.* A sensitive urinary lipoarabinomannan test for tuberculosis. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0123457. doi: 10.1371/journal.pone.0123457.
22. *Alahari A., Saint N., Campagna S. et al.* The N-terminal domain of OmpATb is required for membrane translocation and pore-forming activity in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 2007; 189 (17): 6351–6358.
23. *Ward S.K., Abomoelak B., Hoyer E.A. et al.* CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2010; 77: 1096–1110. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07273.x.
24. *Rodriguez G.M., Smith I.* Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (2): 424–430.
25. *Van Winden V.J., Ummels R., Piersma S.R. et al.* Mycosins Are Required for the Stabilization of the ESX-1 and ESX-5 Type VII Secretion Membrane Complexes. *MBio.* 2016; 7 (5). pii: e01471-16. doi: 10.1128/mBio.01471-16.
26. *Sharrock A., Ruthe A., Andrews E.S.V. et al.* VapC proteins from *Mycobacterium tuberculosis* share ribonuclease sequence specificity but differ in regulation and toxicity. *PLoS One.* 2018 Aug 31; 13 (8): e0203412. doi: 10.1371/journal.pone.0203412.
27. *Авдиенко В.Г., Майоров К.Б., Бабаян С.С. и др.* Действие противотуберкулезных моноклональных антител на течение туберкулеза в эксперименте на мышах. *Международный научно-исследовательский журнал* 2016; 11 (53 Часть 3): 117–120. [Avdienko V.G., Majorov K.B., Babayan S.S. et al. Effect of antimycobacterial monoclonal antibodies on experimental tuberculosis in mice. *Int. J. Reseach J.* 2016; 11 (53 Pt. 3): 117–120 (In Russ.)]. doi: 10.18454/IRJ.2016.53.102.
28. *Авдиенко В.Г., Кондрашов С.Ю., Куликовская Н.В. и др.* Повышение эффективности иммунодиагностики туберкулеза путем применения моноклональных антител против IgG класса иммуноглобулинов человека. *Клин. лаб. диагн.* 1999; (6): 22–35. [Avdienko V.G., Kondrashov S.Yu., Kulikovskaya N.V. et al. Improving the efficacy of tuberculosis immunodiagnosis using anti-human IgG monoclonal antibodies. *Klin. Lab. Diagn.* 1999; (6): 22–35 (In Russ.)].
29. *Smith R.D.* Evaluation of diagnostic tests, and Use diagnostic tests. In.: *Veterinary Clinical Epidemiology: A problem-oriented Approach.* 2-Ed. eds. *Batterworth-Heinemann, Boston, USA;* 1995, 31–70.
30. *Pollock N.R., Macovei L., Kanunfre K. et al.* Validation of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1681 protein as a diagnostic marker of active pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51 (5): 1367–1373. doi: 10.1128/JCM.03192-12.
31. *Yari S., Hadizadeh Tasbiti A., Ghanei M. et al.* Proteomic analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by one-dimensional gel electrophoresis and charge chromatography. *Arch. Microbiol.* 2017; 199 (1): 9–15. doi: 10.1007/s00203-016-1267-8.

Поступила в редакцию 04.04.2019 г.

Сведения об авторах:

Авдиенко Вадим Григорьевич — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»; 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2; e-mail: vg_avdienko@mail.ru; ORCID 0000-0002-1991-9549;

Козлова Ирина Вячеславовна — младший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»; 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2; e-mail: ikozlova_work@mail.ru; ORCID 0000-0002-6328-363X; *Бабаян Сурен Суренович* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»; 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2; e-mail: suren.babayan@mail.ru; ORCID 0000-0002-3900-9155;

Зайцева Анна Сергеевна — кандидат медицинских наук, заведующая 4-м терапевтическим отделением ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»; 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2; e-mail: anyasyls@yandex.ru; ORCID 0000-0001-7155-5730;

Бочарова Ирина Владимировна — кандидат биологических наук, заведующая виварием ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»; 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2; e-mail: 3595598@mail.ru; ORCID 0000-0002-5486-9794;

Гергерт Владислав Яковлевич — доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»; 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2; e-mail: hergertv@mail.ru; ORCID 0000-0002-5262-6991.